Untersuchungen zur Hyaluronidase-Hemmung durch Adrenalin-Dauerinfusion unter Ergotamin bei adrenalektomierten Ratten

von

OTHMAR A. RITZ

München 1962

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Untersuchungen zur Hyaluronidase-Hemmung durch Adrenalin-Dauerinfusion unter Ergotamin bei adrenalektomierten Ratten

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Othmar A. Ritz
aus
Straubing
1962

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. A. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 12. 1962

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Problematik 5
Eigene Versuche 9
Methodik 9
Versuchsreihen 10
Statistische Auswertung 16
Diskussion 20
Zusammenfassung 22
Literaturverzeichnis 23

Problematik

M a t h i e s und Mitarbeiter haben es in umfangreichen Arbeiten unternommen, den Wirkungsmechanismus hyaluronidasehemmender Substanzen in vivo näher aufzuklären. Methodisch wurde dabei das Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading zu Grunde gelegt, so daß sich der Aussagewert der Ergebnisse auf den hemmenden Einfluß auf die dadurch Hyaluronidase-bewirkte Steigerung des Farbstoff-Spreadings bezieht. Im Einzelnen haben die Versuche gezeigt, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung der Salicylate [1, 2], des Chloraethylbenzmethoxazons [3], des Phenylbutazons [4], ebenso der Cortisonderivate [5] und der Moorbäder [6] an die Anwesenheit der Nebennieren gebunden ist. Es wurde nachgewiesen, daß der hyaluronidasehemmende Effekt bei adrenalektomierten Tieren ausbleibt [1-6]. Dieses Ergebnis schien zunächst die früher geäußerte Vermutung der Bedeutung der Nebennierenrinde für die Hyaluronidasehemmung zu bestätigen.

Zur Klärung der Bedeutung der Nebennierenrinde für die das Hyaluronidase-Spreading hemmenden Stoffe wurden Untersuchungen von D o m e n j o z [7] und Versuchsergebnisse von M a t h i e s [6, 8] herangezogen. An Hand dieser Arbeiten konnte man feststellen, daß die genannten hyaluronidasehemmenden Substanzen mit Ausnahme der Glucocorticoide eine Ascorbinsäuredepletion der Nebenniere aufweisen, die bei hypophysektomierten Tieren ausbleibt. Da nach S a y e r s und S a y e r s [9] der Ascorbinsäuredepletionseffekt als ein Zeichen der Aktivierung der Nebennierenrinde aufzufassen ist, muß angenommen werden, daß bei hypophysektomierten Tieren keine inkretorische Funktion der Nebennierenrinde vorliegt, obwohl der hyaluronidasehemmende Effekt entsprechend wirksamer Substanzen nach M a t h i e s und Mitarbeitern [1-6, 10] bei hypophysektomierten Ratten erhalten blieb. Deshalb kann gefolgert werden, daß eine Aktivierung der Nebennierenrindentätigkeit für das Zustandekommen des hyaluronidasehemmenden Effekts ohne Bedeutung ist.

So mußte weiterhin angenommen werden, daß die Hyaluronidasehemmung über eine Nebennierenmarksfunktion abläuft. Diese Annahme wurde durch

Arbeiten von M a t h i e s und Mitarbeitern bestätigt, nach denen die Nebennierenmark-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin nicht nur bei intakten [11], sondern auch bei adrenalektomierten Tieren [12] eine Hyaluronidasehemmung gleicher Größenordnung hervorrufen. Ferner haben M a t h i e s und Mitarbeiter [11] zeigen können, daß die hemmende Wirkung sowohl des Adrenalins und Noradrenalins, als auch der anderen untersuchten hyaluronidasehemmenden Stoffe durch das Adrenolytikum Ergotamintartrat blockiert wird. Diese Versuche bestätigen also weiterhin eine Nebennierenmarksfunktion beim Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung in vivo.

Diese über das Nebennierenmark laufende Wirkung machte auch die Überprüfung des Einflusses von Ganglienblockern auf den hyaluronidasehemmenden Effekt der einzelnen Substanzen interessant. M a t h i e s und Mitarbeiter [13] fanden durch eine große Anzahl von Versuchen durch Pendiomid als Ganglienblocker eine Blockade der Hyaluronidasehemmung der Nebennierenmark-Katecholamine, des Phenylbutazons, Prednisolons, Oestronsulfates und der Moorbäder. Die Ganglienblocker blockieren also hier das Nebennierenmark. Die ganglienblockierenden Substanzen beeinflussen die synaptische Übertragung von den Nebennierenneuronen auf die Markzellen, womit die nervösbedingte Ausschüttung der Pressorhormone aus der Nebenniere gehemmt wird.

Vergleichsweise Versuche mit Registrierung der Pupillenweite ergaben, daß die Hyaluronidasehemmung durch Adrenalin und Noradrenalin erst zu einem Zeitpunkt auftraten, in dem die bekannten Katecholaminwirkungen längst abgeklungen sind [12]. Der Zeitpunkt der auftretenden Hemmung ist dosisbedingt, wobei die Hemmung bei geringeren Katecholamindosen früher auftritt, als bei höheren [10]. Das Ausmaß der Hyaluronidasehemmung ist nicht signifikant dosisabhängig, jedoch ist eine Mindestmenge von über 0,5 Gamma Adrenalin bzw. Noradrenalin/100 g Tier notwendig, um eine meßbare Hemmung zu erzielen.

Dies drängt folgende Fragen über ihr Zustandekommen auf:

1. Handelt es sich um einen vagalen Gegenregulationseffekt?
2. Ist eine Latenzzeit maßgeblich?
3. Hat das Absinken des Katecholaminspiegels nach vorherigem Anstieg eine auslösende Wirkung?
4. Oder sind Adrenalinabbauprodukte die wirksamen Stoffe?

Die Beantwortung der ersten Frage wurde durch Versuchsreihen gegeben, bei denen der Vagusstoff Acetylcholin und das esterasehemmende Prostigmin injiziert wurden. Verwendung fanden dabei adrenalektomierte Tiere, um adrenergische Gegenregulationen auszuschalten. Es konnte keine Hyaluronidasehemmung festgestellt werden, so daß eine Vaguswirkung verneint werden muß [10]. Die Frage 2 nach einer zeitlichen Abhängigkeit von der Katecholaminwirkung oder einem Wirkungsablauf, der erst nach dem Abklingen der Katecholaminwirkung in Gang gesetzt wird, haben die Versuche mit Adrenalindauerinfusion über 2 Stunden bei adrenalektomierten Tieren geklärt. Sie konnten zeigen, daß in einem bestimmten Zeitabstand (15 bis 45 Minuten) nach Absetzen der Infusion die Hyaluronidasehemmung sichtbar wird. Mit anderen Worten: Es kann also eine Latenzzeit nicht maßgeblich sein, da erst nach Absetzen eine Hemmung auftrat [14]. Die Frage 3 beantwortet sich durch die gleichen Versuchsergebnisse [14], wonach ein gleichmäßig erhöhter Katecholaminspiegel keinerlei geänderte Reaktionslage schuf, sondern erst ein Absinken des erhöhten Spiegels eine Hemmung verursachte. Die Frage 4 verneint sich aus der Tatsache heraus, daß nach 2 Stunden Adrenalindauerinfusion, während der keine Hyaluronidasehemmung auftrat [14], genügend Abbauprodukte im Kreislauf zirkulieren müßten. Die Frage nach der Wirksamkeit insbesondere des Adrenochroms ist insoweit gerechtfertigt, als eine Hyaluronidasehemmung nicht nur dem Adrenalin eigen ist, sondern auch dem Adrenochrom [15], allerdings erst in höherer Dosierung.

In weiteren Versuchen wurden auf die Adrenalindauerinfusion zwei Spitzen gesetzt in Form zweier zusätzlicher i.v. Injektionen. Dabei trat nach jeder dieser Applikationen eine Hyaluronidasehemmung schon während der Dauerinfusion ein [14]. Demnach tritt eine Hyaluronidasehemmung immer nach einem Absinken eines vorher erhöhten Adrenalinblutspiegels auf ein niedrigeres Niveau ein, wobei das absolute Niveau ohne Bedeutung ist. Also nicht das Absinken auf das Normalniveau oder darunter sondern jegliches Absinken des Adrenalinblutspiegels ist maßgebend. Des weiteren wurden Versuchsreihen über den Einfluß des Iproniacids durch Monoaminooxydase-Hemmung durchgeführt [16]. Es kommt dabei zu einer Hemmung der Adrenalinausschüttung aus dem Nebennierenmark und damit einer Senkung des Katecholaminspiegels im Blut. Auch dabei tritt eine Hyaluronidasehemmung ein.

Es bleibt nach den bisher geschilderten Versuchen die Feststellung, daß jegliches Absinken des Katecholaminblutspiegels eine Hyaluronidasehemmung verursacht. Das gleiche gilt anscheinend auch für die Fälle, in denen an einem peripheren Angriffspunkt die Effekte des gleichbleibenden Blutspiegels am peripheren Erfolgsorgan nicht mehr zur Auswirkung kommen, und damit die dann vorliegenden Verhältnisse, funktionell gesehen, einem Absinken des Katecholaminblutspiegels gleichzusetzen wären. Adrenolytika beeinflussen einmalige oder wiederholte Adrenalininjektionen adrenolytisch, so daß ihre Hyaluronidasehemmung nicht mehr festgestellt werden kann. M a t h i e s und Mitarbeiter [17] fanden, daß sonderbarerweise Ergotamintartrat, allein gegeben, selbst einen hyaluronidasehemmenden Effekt besitzt. Als Erklärung für dieses Verhalten wurde eine Beeinflussung des Adrenolytikums auf den normalen Katecholaminblutspiegel diskutiert. Ein solcher Effekt ist auch durch die von H e i n z g e l und Mitarbeitern [18] mitgeteilte blutdrucksenkende Wirkung des Regitins am gesunden Menschen bekannt. Andererseits wird die hyaluronidasehemmende Wirkung des Ergotamins bei experimenteller Adrenalinzufuhr nicht deutlich [11], da hier lediglich die hyaluronidasehemmende Wirkung des applizierten Adrenalins aufgehoben wird. Wir hatten gesehen, daß Adrenalindauerinfusionen bei adrenalektomierten Tieren keine Hyaluronidasehemmung hervorrufen, da hier wegen des gleichmäßig erhöhten Katecholaminblutspiegels eine Hyaluronidasehemmung nicht auftreten kann. Wenn nun Ergotamin einen gleichmäßigen Katecholaminblutspiegel lytisch beeinflußt, und damit eine Hyaluronidasehemmung sichtbar wird, müßte auch ein durch Dauerinfusion von Adrenalin bei adrenalektomierten Tieren gleichmäßig erhöhter Blutspiegel durch Ergotamin beeinflußt werden. Es wäre in diesem Falle anzunehmen, daß bei einer Adrenalindauerinfusion unter Ergotamin bei adrenalektomierten Tieren eine Hyaluronidasehemmung auftritt. Diese Versuchsreihen wurden in der vorgelegten Arbeit durchgeführt.

Eigene Versuche

Methodik

Für die Versuche wurden männliche weiße Ratten im Gewicht von 160 bis 200 g verwendet. Die Adrenalektomie wurde 48 Stunden vor dem Versuchsbeginn in Äthernarkose durchgeführt. Die adrenalektomierten Tiere wurden mit Hafermark und Dextropur kohlehydratreich ernährt, und erhielten zur Aufrechterhaltung ihres Ionenhaushaltes physiologische NaCl-Lösung als Trinkflüssigkeit. 48 Stunden nach Adrenalektomie ist nach K a r g [19], B a c h m a n n [20] und C a n a l i s [21] kaum ein Regeneration funktionstüchtigen Nebennierengewebes anzunehmen.

Die Hyaluronidaseaktivität wurde an der Ausbreitung einer Farbstoff- bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vor und zu verschiedenen Zeiten während des Versuches mit den zu prüfenden Substanzen ermittelt. Hierzu wurde die Bauchhaut der Tiere vor dem Versuch mit Pilca enthaart. Die reine Farbstoff-Quaddel wurde mit 0,1 ccm einer 0,06%igen Evansblue-Lösung streng intracutan gesetzt. Zur Herstellung der Farbstoff+Hyaluronidase-Lösung wurden in 2 ccm der genannten Farbstofflösung 150 IE Hyaluronidase (Kinetin) gelöst, so daß bei der intracutanen Applikation von 0,1 ccm Lösung 7,5 IE Hyaluronidase zur Wirkung kamen.

Ausgewertet wurde die 10 Minuten nach Injektion erreichte Ausbreitung der Farbstoff-Flecken. Diese wurden durch Übertragung der Konturen auf Zelluloidstreifen und anschließende planimetrische Ausmessung bestimmt. Nach M a d i n a v e i t i a [22] verläuft das Spreading zweiphasisch, wobei nur die innerhalb der ersten 10 Minuten ablaufende Reaktion als ein sicherer Effekt der Hyaluronidase zu werten ist. Die Lokalisationsverteilung nach Aufstellung eines lateinischen Quadrates - wie in der statistischen Auswertung eingehend beschrieben - ermittelt etwaige Lokalisations-Differenzen der Ausbreitung. Naturgemäß zeigt die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel eine weitaus raschere Ausbreitung als die reine Farbstoff-Quaddel. Dagegen weist die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel eine gewisse Hemmung der Ausbreitung auf, wenn eine hyaluronidasehemmende Substanz appliziert wird.

Die Versuche wurden in Narkose von 20 mg Evipan und 8,8 mg Luminal-Natrium pro 100 g Tier i.m. durchgeführt. 20 Minuten vor Beginn der Adrenalindauerinfusion (Suprarenin) wurde Ergotamintartrat (Gynergen) in der Dosis 0,8 mg/100 g Tier subcutan injiziert, und dies während der Dauer der Infusion alle 20 Minuten in gleicher Dosis wiederholt. 20 Minuten nach der ersten Ergotamin-Applikation wurde die Adrenalin-Dauerinfusion in die freigelegte Femoralvene angelegt. Es wurden zu Infusionsbeginn 1 Gamma/100 g Tier über 1 Minute und dann im Verlauf von 2 Stunden bis zum Versuchsende 0,5 Gamma/100 g Tier pro Minute injiziert.

I. Versuchsreihe

Für je 6 adrenalektomierte Ratten wurde das Lokalisationsschema an Hand eines lateinischen Quadrates aufgestellt und je eine Farbstoff- und eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel intracutan gesetzt. Nach Abnahme der Konturen der jeweiligen Ausbreitung wurde Ergotamin (Gynergen) s.c. injiziert und 20 Minuten danach mit der zweiten Ergotamingabe die Infusion angelegt. 15 und 45 Minuten nach Infusionsbeginn wurden erneut Farbstoff- und Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln intracutan gesetzt, die nach 10 Minuten abgenommen wurden. Das Versuchsgewicht der adrenalektomierten Tiere und die planimetrischen Werte finden sich in Tabelle 2 und 3, das Lokalisationsschema in Tabelle 1.

II. Versuchsreihe

Es wurde in gleicher Weise vorgegangen wie in der I. Versuchsreihe und ebenso 6 adrenalektomierte Tiere verwendet. Es wurde während der Adrenalindauerinfusion Ergotamin injiziert, jedoch die Farbstoff- und die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel erst nach 80 bzw. 120 Minuten nach Infusionsbeginn gesetzt und nach 10 Minuten abgenommen. Die Lokalisation und die Werte finden sich in den Tabellen VI - VIII.

	Lokalisation					
	1	2	3	4	5	6
Tier Nr. 1	F_{45}	H_{45}	H_{15}	F_{v}	F_{15}	H_{v}
2	F_{v}	H_{15}	H_{v}	H_{45}	F_{45}	F_{15}
3	H_{45}	H_{v}	F_{15}	H_{15}	F_{v}	F_{45}
4	H_{15}	F_{15}	F_{45}	H_{v}	H_{45}	F_{v}
5	H_{v}	F_{45}	F_{v}	F_{15}	H_{15}	H_{45}
6	F_{15}	F_{v}	H_{45}	F_{45}	H_{v}	H_{15}

Tabelle I

(Versuchsreihe I, Lokalisationsschema)

Tier Nr.	Gewicht in g	Farbstoff-Quaddel vor	Farbstoff-Quaddel 15'nach	Farbst.-Hyase-Quaddel vor	Farbst.-Hyase-Quaddel 15'nach
1	170	134 mm^2	122 mm^2	229 mm^2	180 mm^2
2	190	129 mm^2	118 mm^2	231 mm^2	178 mm^2
3	180	137 mm^2	132 mm^2	239 mm^2	176 mm^2
4	190	131 mm^2	124 mm^2	230 mm^2	175 mm^2
5	160	137 mm^2	125 mm^2	240 mm^2	182 mm^2
6	175	139 mm^2	126 mm^2	235 mm^2	156 mm^2

Tabelle II

(Versuchsreihe I)

Tier Nr.	Gewicht in g	Farbstoff-Quaddel vor	Farbstoff-Quaddel 45'nach	Farbst.-Hyase-Quaddel vor	Farbst.-Hyase-Quaddel 45'nach
1	170	134 mm^2	119 mm^2	229 mm^2	169 mm^2
2	190	129 mm^2	106 mm^2	231 mm^2	149 mm^2
3	180	137 mm^2	99 mm^2	239 mm^2	168 mm^2
4	190	131 mm^2	108 mm^2	230 mm^2	164 mm^2
5	160	137 mm^2	112 mm^2	240 mm^2	165 mm^2
6	175	139 mm^2	120 mm^2	235 mm^2	167 mm^2

T a b e l l e III
(Versuchsreihe I)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	271	54	1,80	-
Zwischen Verfahren	5	59.934	11.987	100,00	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	462	92	3,07	5%
Zw. Quaddel-Typen	1	41.006	41.006	100,00	0,1%
Zw.Kontr.u.V.-Zeiten(Farbst)	1	1.145	1.145	38,17	0,1%
Zw.Versuchs-Zeiten (Farbst)	1	574	574	19,13	0,1%
Zw.Kontr.u.V.-Zeiten(Hyase)	1	16.857	16.857	100,00	0,1%
Zw.Versuchs-Zeiten (Hyase)	1	352	352	11,73	1%
Rest-Varianz	20	604	30		
Gesamt-Varianz	35	61.271	1.751		

T a b e l l e IV
(Versuchsreihe I)

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Sicherung
F_v	134	15,0		
FH_v	234	22,4		
$F_{15'}$	124	21,4	- 10	1%
$FH_{15'}$	174	88,6	- 60	0,1%
$F_{45'}$	111	64,6	- 23	0,1%
$FH_{45'}$	163	55,0	- 71	0,1%

Tabelle V
(Versuchsreihe I)

	Lokalisation					
	1	2	3	4	5	6
Tier Nr. 1	F_v	F_{120}	F_{80}	H_{120}	H_{80}	H_v
2	H_{80}	F_{80}	H_v	F_v	F_{120}	H_{120}
3	F_{120}	H_v	H_{120}	H_{80}	F_{80}	F_v
4	F_{80}	H_{120}	F_v	F_{120}	H_v	H_{80}
5	H_v	F_v	H_{80}	F_{80}	H_{120}	F_{120}
6	H_{120}	H_{80}	F_{120}	H_v	F_v	F_{80}

Tabelle VI
(Versuchsreihe II, Lokalisationsschema)

Tier Nr.	Gewicht in g	Farbstoff-Quaddel vor	Farbstoff-Quaddel 80'nach	Farbst.-Hyase-Quaddel vor	Farbst.-Hyase-Quaddel 80'nach
7	170	141 mm^2	134 mm^2	222 mm^2	155 mm^2
8	160	144 mm^2	139 mm^2	235 mm^2	151 mm^2
9	190	135 mm^2	132 mm^2	230 mm^2	187 mm^2
10	200	132 mm^2	123 mm^2	238 mm^2	152 mm^2
11	180	134 mm^2	128 mm^2	233 mm^2	149 mm^2
12	160	139 mm^2	124 mm^2	239 mm^2	148 mm^2

T a b e l l e VII
(Versuchsreihe II)

Tier Nr.	Gewicht in g	Farbstoff-Quaddel vor	Farbstoff-Quaddel 120'nach	Farbst.-Hyase-Quaddel vor	Farbst.-Hyase-Quaddel 120'nach
7	170	141 mm^2	127 mm^2	222 mm^2	123 mm^2
8	160	144 mm^2	122 mm^2	235 mm^2	119 mm^2
9	190	135 mm^2	115 mm^2	230 mm^2	107 mm^2
10	200	132 mm^2	115 mm^2	238 mm^2	114 mm^2
11	180	134 mm^2	118 mm^2	233 mm^2	122 mm^2
12	160	139 mm^2	107 mm^2	239 mm^2	129 mm^2

T a b e l l e VIII
(Versuchsreihe II)

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p
Zwischen Tieren	5	171	34	-	
Zwischen Verfahren	5	56.928	11.386	100,00	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	574	115	1,67	-
Zw. Quaddel-Typen	1	15.376	15.376	100,00	0,1%
Zw.Kontr.u.V.-Zeiten(Farbst)	1	765	765	11,09	1%
Zw. Versuchs-Zeiten (Farbst)	1	481	481	6,97	5%
Zw.Kontr.u.V.-Zeiten (Hyase)	1	35.973	35.973	100,00	0,1%
Zw. Versuchs-Zeiten (Hyase)	1	4.332	4.332	62.78	0,1%
Rest-Varianz	20	1.383	69		
Gesamt-Varianz	35	59.056	1.687		

T a b e l l e IX
(Versuchsreihe II)

	$\bar{x}(V)$	$s^2(V)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$	Sicherung
F_v	137	21,0		
FH_v	233	39,0		
$F_{80'}$	130	38,0	- 7	-
$FH_{80'}$	157	222,0	- 76	0,1%
$F_{120'}$	117	46,6	- 20	1%
$FH_{120'}$	119	58,8	-114	0,1%

T a b e l l e X
(Versuchsreihe II)

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Die Methoden, die zur statistischen Auswertung der Versuche herangezogen wurden, ergaben sich aus der Anlage der Versuchspläne. Diese Versuchspläne wurden in Form von "Lateinischen Quadraten" entworfen. Die Bauchhaut jedes Versuchstieres (adrenalektomierte Ratten) wurde hierbei als ein Versuchsfeld mit 6 verschiedenen Lokalisationen aufgefaßt; diesen stehen 6 verschiedene "Verfahren" gegenüber. Diese 6 Verfahren setzen sich aus je einer "Kontrolle" und je zwei "Versuchszeiten" für jeden der beiden Quaddel-Typen, reine Farbstoff-Quaddel und Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel, zusammen. Jeder Versuch wird außerdem an 6 verschiedenen Versuchstieren durchgeführt.

Mit der Anlage der Versuche im "Lateinischen Quadrat" werden drei verschiedene systematische Faktoren erfaßt, die möglicherweise einen Einfluß auf das Ergebnis des Versuches haben. Diese systematischen Faktoren sind einmal die Lokalisation der jeweiligen Quaddel auf der Bauchhaut des Versuchstieres, dann die Wirkung des jeweiligen Verfahrens und schließlich die individuelle Reaktionslage des jeweiligen Versuchstieres. Entsprechend der Fragestellung, welche den Versuchen zugrunde lag, interessierte primär die Größe der Wirkung der einzelnen Verfahren; die Kenntnis des Einflusses der beiden anderen systematischen Faktoren dient dazu, die Präzision des Versuches und damit der aus ihm gewonnenen Aussagen zu erhöhen. Würde man den Einfluß dieser Faktoren nicht berücksichtigen, so gingen sie in die experimentelle Variabilität der Meßwerte ein und würden damit möglicherweise eine Vergrößerung dieser experimentellen Variabilität bewirken. Die experimentelle Variabilität der Meßwerte, welche diejenigen Unterschiede zwischen den Meßwerten darstellt, die nicht mehr durch die drei oben genannten Faktoren erklärt werden können, ist ein Maß für die Genauigkeit der Methodik und der Gleichartigkeit in der Reaktion der Tiere auf die experimentellen Eingriffe.

Zur statistischen Auswertung von Versuchen, die als "Lateinische Quadrate" angelegt wurden, sind ganz bestimmte Formen von Varianz-Analysen entwickelt worden. Im vorliegenden Fall werden

durch diese Varianz-Analysen die systematischen Einflüsse, welche die Versuchstiere und die Lokalisationen auf das Versuchsergebnis haben, in Form der Varianz-Komponenten "Zwischen den Tieren" und "Zwischen den Lokalisationen" erfaßt; die unterschiedliche Wirksamkeit der 6 Verfahren wird durch die Varianz-Komponente "Zwischen den Verfahren" ermittelt. Die experimentelle Variabilität, d.h. derjenige Anteil der Variabilität der Versuchswerte, der nicht auf die soeben genannten systematischen Faktoren rückführbar ist, wird in diesen Varianz-Analysen in Form der "Rest-Varianz" bestimmt. Die Frage, ob einer der betrachteten systematischen Faktoren einen Einfluß hat, der nicht mehr als zufällig angesehen werden kann (der statistisch gesichert ist), wird dadurch geprüft, daß die entsprechende Varianz-Komponente mit der experimentellen Variabilität mit Hilfe des F-Tests verglichen wird. Ergibt sich hierbei, daß die Varianz-Komponente, die zu einem systematischen Faktor gehört, statistisch gesichert größer ist als die experimentelle Variabilität, so kann dies als statistische Sicherung dafür angesehen werden, daß dieser systematische Faktor einen nicht mehr zufälligen Einfluß ausübt.

Hinsichtlich der Wirksamkeit der Verfahren bzw. der Unterschiede in der Wirksamkeit der Verfahren interessierte bei den vorliegenden Versuchen primär die Frage, ob bei den einzelnen Quaddel-Typen zwischen den Versuchs-Zeiten und den Kontrollen Unterschiede vorliegen. Die Prüfung dieser Frage wurde mit Hilfe von orthogonalen Vergleichen durchgeführt, bei denen die Varianz-Komponente "Zwischen den Verfahren" in 5 Einzel-Komponenten zerlegt wurde. Hierbei wurde für jeden Quaddel-Typus geprüft, ob zwischen den Versuchs-Zeiten und der Kontrolle eine statistisch gesicherter Unterschied vorliegt; anschließend wurde geprüft, ob zwischen den beiden Versuchszeiten selber statistisch gesicherte Unterschiede vorliegen.

Den Versuchsplänen und somit den Varianz-Analysen liegt ein lineares statistisches Modell zugrunde. Dem entspricht, daß als Maß für die Größe der Wirksamkeit der einzelnen Verfahren die Differenz zwischen ihren Mittelwerten angesehen wird, wobei diese Mittelwerte aus allen Werten gebildet werden, die für das be-

treffende Verfahren an den 6 Versuchstieren beobachtet wurden. Diese Mittelwertsdifferenzen

$$\sigma\bar{x}\ (t) = \bar{x}\ (t) - \bar{x}\ (K)$$

haben wir in den Tabellen V und X für die Versuchszeiten gegenüber der jeweiligen Kontrolle angegeben, und zwar in der mit "$\bar{x}(t) - \bar{x}(K)$" überschriebenen Spalte. Ein negatives Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $\sigma\bar{x}(t)$ bedeutet, daß eine Verminderung der Diffusionsgeschwindigkeit zu den Versuchszeiten gegenüber der Kontrolle vorliegt; im Falle der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel kann dies dahingehend gedeutet werden, daß eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität zu den Versuchszeiten beobachtet werden konnte. Prinzipiell wird in den Varianz-Analysen die Frage geprüft, ob eine solche Mittelwertsdifferenz $\sigma\bar{x}(t)$ statistisch gesichert von 0 verschieden ist, bzw. mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit diese Behauptung aufgestellt werden kann. Von einer statistischen Sicherung kann jedoch nur dann gesprochen werden, wenn diese Irrtumswahrscheinlichkeit maximal 5% beträgt; eine ausreichende statistische Sicherung liegt allerdings erst dann vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit maximal 1% ist. Wir haben daher in der mit "Sicherung" überschriebenen Spalte diese Irrtumswahrscheinlichkeit nur dann angegeben, wenn sie maximal den Wert 5% besitzt.

Bevor wir die Ergebnisse der statistischen Auswertung im einzelnen besprechen, sei noch kurz die Bedeutung der Abkürzungen angegeben, die in den Schemata der Varianz-Analysen verwendet wurden:

n: die Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente;
SAQ: das Summen-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
MAQ: das Mittlere-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
$F_{emp.}$: Varianz-Quotient zwischen der jeweiligen Varianz-Komponente und der experimentellen Variabilität (Rest-Varianz);
p: Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten $F_{emp.}$ in der zugehörigen F-Prüfverteilung.

Im einzelnen ergaben sich aus der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse die nachstehenden Sachverhalte: Die reine Farbstoff-Quaddel erfährt zu sämtlichen Zeitpunkten des Versuches

eine Hemmung ihrer Ausbreitungsgeschwindigkeit, die zu den Zeitpunkten 15', 45' und 120' statistisch gesichert werden konnte. Die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel weist zu allen Zeitpunkten des Versuches gegenüber den Kontroll-Quaddeln eine statistisch hoch gesicherte Hemmung ihrer Diffusionsgeschwindigkeit auf, die ihren maximalen Wert zum Zeitpunkt 120' annimmt. Gemessen an den Mittelwertsdifferenzen $\sigma_{\bar{x}}(t)$ ist die Hemmung in der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel wesentlich größer als diejenige der reinen Farbstoff-Quaddel; der Unterschied zwischen diesen beiden Hemmungen läßt sich auch nicht mehr als ausschließlicher Effekt der unterschiedlichen Ausgangslagen der beiden Quaddel-Typen erklären. Es muß daher angenommen werden, daß die Adrenalin-Dauerinfusion bei adrenalektomierten Tieren unter Ergotamin eine spezifische hyaluronidasehemmende Wirkung ausübt.

Bemerkenswert ist, daß wir bei einer der beiden Versuchsreihen (Versuchsreihe I) einen statistisch schwach gesicherten Einfluß der Lokalisation auf die Versuchsergebnisse nachweisen konnten (Irrtumswahrscheinlichkeit 5%). Im wesentlichen beruht dieser Einfluß darauf, daß die an der Lokalisation 6 gesetzten Quaddeln im Mittel kleiner sind als diejenigen, die an den anderen Lokalisationen gesetzt wurden. Es muß jedoch vermutet werden, daß es sich hierbei um einen rein zufälligen Effekt handelt, da wir bei allen bisherigen Versuchen noch nie einen Einfluß der Lokalisation nachweisen konnten. Andererseits muß berücksichtigt werden, daß wir bisher noch keine Erfahrungen über den Einfluß der Lokalisation bei adrenaektomierten Tieren besitzen; es wäre daher zu prüfen, ob hier vielleicht ein Sonderfall vorliegt.

Die Größe der experimentellen Variabilität (Rest-Varianz) liegt bei den vorliegenden Versuchen durchaus in den Grenzen, die wir auf Grund von systematischen Versuchen für die hier verwandte Methode ermittelt haben. Ein durchaus zu erwartender Einfluß der Adrenalektomie auf die experimentelle Variabilität (größere Unterschiede in der Reaktionsweise der Tiere auf Grund der Adrenalektomie) scheint somit nicht vorzuliegen.

Diskussion

Die Versuchsergebnisse haben gezeigt, daß bei adrenalektomierten Tieren, denen eine Dauerinfusion von Adrenalin intravenös verabfolgt wurde, eine Hemmung des Farbstoff+Hyaluronidase-Spreadings zu beobachten war, wenn ihnen 20 Minuten vor Beginn der Infusion Ergotamintartrat subcutan verabfolgt wurde. Es wurde einleitend darauf hingewiesen, daß eine Adrenalindauerinfusion während der Infusionsdauer im Gegensatz zu einmaliger Adrenalinapplikation bei adrenalektomierten Tieren keine Hemmung erzielen läßt, wenn kein Ergotamin verabfolgt wird [14]. In früheren Versuchen von M a t h i e s und Mitarbeitern war festgestellt worden, daß jedes Absinken des Katecholaminblutspiegels oder eine periphere Sympathicus-Blockade eine hyaluronidasehemmung verursacht [14, 16, 23]. Damit hat eine fortlaufende gleichmäßige Erhöhung des Katecholaminblutspiegels keinen Effekt auf die spreadingsteigernde Wirkung der Hyaluronidase. Daß Ergotamin auch bei einer Adrenalindauerinfusion eine Hemmung der Hyaluronidasewirkung erzielen läßt, kann verschiedene Ursachen haben, die im Folgenden diskutiert werden.

Zunächst ist festzustellen, daß eine Erklärung im Sinne eines adrenolytischen Effektes auf die bei Beginn der Infusion erfolgende Blutspiegelerhöhung ausscheidet, da dann bei einmaliger Adrenalinzufuhr unter Ergotamin ebenfalls keine Hyaluronidase-Hemmung eintreten dürfte. Dieses ist jedoch nach früheren Untersuchungen nicht der Fall, da Ergotamin die hyaluronidasehemmende Wirkung des einzeitig applizierten Adrenalins blockiert. Es muß sich also bei den Versuchsergebnissen der vorgelegten Arbeit um eine Einwirkung auf den gleichmäßig erhöhten Blutspiegel handeln. Da Ergotamin allein bei intakten Ratten eine Hyaluronidasehemmung verursacht [17], ist ein lytischer Einfluß auf einen konstanten Katecholaminblutspiegel anzunehmen. Da andererseits Ergotamin die hyaluronidasehemmende Wirkung einmaliger [11] oder auch wiederholter [24] Adrenalingaben nicht auftreten läßt, ist auch eine lytische Wirkung auf Katecholamingaben anzunehmen, die den Blutspiegel kurzfristig über das Normalniveau anheben. Vermutlich sind deshalb verschiedene

Wirkungen des Ergotamins zu unterscheiden. Ergotamin kann möglicherweise einen bestehenden gleichmäßigen sowohl normalen als auch experimentell erhöhten Katecholaminblutspiegel pharmakologisch beeinflussen und damit eine Wirkung erzielen, die funktionell gesehen einem Absinken des Blutspiegels gleichzustellen ist. Deshalb führt Ergotamin bei intakten Ratten mit ihrem normalen Katecholaminblutspiegelniveau und bei adrenalektomierten Tieren mit einem experimentell durch eine Adrenalininfusion gleichbleibend erhöhten Katecholamin-Blutspiegel zu einer Hemmung der Hyaluronidasewirkung. Dieses Verhalten findet seine Parallele in den eingangs geschilderten Ergebnissen von H e i n z e l und Mitarbeitern [18], daß das Adrenolyticum Regitin eine blutdrucksenkende Wirkung beim gesunden Menschen entfaltet. Andererseits beeinflußt Ergotamin im Sinne der üblichen Adrenolyse einzelne Adrenalininjektionen, indem es ihre pharmakologischen Wirkungen aufhebt. Diese Einwirkung auf das Adrenalin ist pharmakologisch allgemein bekannt und durch zahlreiche Versuchsergebnisse bewiesen. Im gleichen Sinne liegen die Verhältnisse hinsichtlich des blockierenden Einflusses des Ergotamins auf die hyaluronidasehemmende Wirkung akuter Adrenalin-Applikationen. Voraussetzung für die sympathicolytische Wirkung des Ergotamins auf Adrenalin scheint die kurzfristige Dauer der Adrenalinblutspiegel-Erhöhung, bzw. ein phasischer Verlauf der Blutspiegelkurve zu sein. Diese Vermutung deckt sich mit der Annahme von B e r n s m e i e r [25], daß die Blutdruckwirkung von Noradrenalin durch Sympathicolytika deshalb nicht umgekehrt wird, weil dem Noradrenalin der phasische Ablauf der Blutdruckkurve fehlt.

Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurde der hyaluronidasehemmende Effekt des Ergotamins bei einem gleichbleibend erhöhten Katecholaminblutspiegel untersucht. Da eine hemmende Wirkung des Ergotamins auf das Hyaluronidase-Spreading bei intakten Ratten bekannt ist, war zu untersuchen, inwieweit sich sein adrenolytischer Einfluß auf einen konstanten Katecholaminblutspiegel erstreckt. Es wurde festgestellt, daß bei Erfüllung aller geforderten experimentellen Voraussetzungen unter Ergotamin auch bei adrenalektomierten Ratten bei einem künstlich gleichmäßig erhöhten Katecholaminblutspiegel - wie er durch die Dauerinfusion erreicht war - eine Hyaluronidase-Hemmung eintritt.

Literaturverzeichnis

1) Mathies, H. u. A. Jankowski: Klin. Wschr. 35, 1676 (1957)

2) Mathies, H.: Arzneimittelforsch. 8, 233 (1958)

3) Mathies, H. u. G. v. Werther: Arzneimittelforsch. 9, 576 (1959)

4) Mathies, H., I. Diechele u. M. Hartmann: Ärztl. Forsch. XIV, I/160(1960)

5) Mathies, H.: Zschr. ges. exp. Med. 131, 118 (1959)

6) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 308 (1959)

7) Domenjoz, R.: Arch. exp. Path. Pharmakol. 225, 14 (1955)

8) Mathies, H., E. Fuchs u. D. Hiekmann: Fund. balneo.-bioclim. 1, 433 (1960)

9) Sayers, G. u. M. Sayers: Endocrinology 40, 256 (1947)

10) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 205 (1959)

11) Mathies, H., A. Glück, J. Paulantzas u. D. Schmidt: Med. Exp. 1, 64 (1959)

12) Mathies, H.: Arch. int. pharmacodyn. CXXIII, 334 (1960)

13) Mathies, H., G. Oestreich u. K. Schwalbach: in Vorbereitung

14) Mathies, H. u. G. Schlierf: Med. Exp. 2, 334 (1960)

15) Mathies, H. u. W. Becker: in Vorbereitung

16) Mathies, H. u. W. Reindl: im Manuskript

17) Mathies, H. u. E. Loenicker: in Vorbereitung

18) Heinzel, F., K. Mathes, K. Mechelke u. E. Wurzen: Cardiologia 21, 743 (1952)

19) Karg, H.: persönliche Mitteilung

20) Bachmann, R.: Anatomie d. Menschen VI, 5, 222 (Springer, Berlin/ Göttingen/Heidelberg, 1954)

21) Canalis, P.: zit. Bachmann (20)

22) Madinaveitia, J.: Biochemie J. 32, 1806 (1938)

23) Mathies, H.: Med. Exp. 4, 12 (1961)

24) Mathies, H., K. Herzberg u. E. Apostolopoulos: in Vorbereitung

25) Bernsmeier, A.: Die chemische Blockierung des adrenergischen Systems am Menschen. Springer-Verlag, Wien, 1954

Herrn Professor Dr. W. Seitz danke ich für die Überlassung des Themas, und Herrn Dr. H. Mathies bin ich für die Beratung während der Durchführung der Versuche und der Abfassung der Arbeit zu besonderem Dank verbunden. Die statistische Auswertung wurde freundlicherweise von Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich übernommen.

Als erstes von zwei Kindern des Oberregierungsveterinärrats Dr. med. vet. Othmar M. Ritz und seiner Ehefrau Anna-Christa Ritz, geb. Berger, wurde ich am 11. Juni 1935 in Neutitschein geboren. Nach vier Jahren Volksschule besuchte ich die Oberrealschule in Nördlingen und Straubing, wo ich 1956 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1956/57 begann ich das Medizinstudium an der Universität München und bestand dort im Sommer 1959 die ärztliche Vorprüfung. Meine klinischen Semester verbrachte ich ebenfalls in München und unterziehe mich dort nach dem Sommer-Semester 1962 der ärztlichen Prüfung.